

Documentos

ISSN 1517-5111
Outubro, 2012

89

Avaliação Toxicopatológica de Biopesticidas em Roedores: Revisão dos Ensaio da Fase 1

Documentos 89

Avaliação Toxicopatológica de Biopesticidas em Roedores: Revisão dos Ensaio da Fase 1

Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 Km 127,5 - Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

CEP 13820-000 Jaguariúna, SP

Fone: (19) 3311-2650

Fax: (19) 3311-2640

<http://www.cnpma.embrapa.br>

sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ladislau Araújo Skorupa*

Secretária-Executiva: *Vera Lúcia S. S. de Castro*

Secretário: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecário: *Victor Paulo Marques Simão*

Membro Nato: *Marcelo Augusto Boechat Morandi*

Membros: *Lauro Charlet Pereira, Fagoni Fayer Calegario, Aline de Holanda Nunes Maia, Nilce Chaves Gattaz, Marco Antonio Ferreira Gomes e Rita Carla Boeira*

Editoração eletrônica: *Alexandre Rita da Conceição*

Revisão de texto: *Nilce Chaves Gattaz*

Normalização Bibliográfica: *Victor Paulo Marques Simão*

1ª edição eletrônica (2012)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio Ambiente

Castro, Vera Lucia Scherholz Salgado de.

Avaliação toxicopatológica de biopesticidas em roedores: revisão dos ensaios da fase 1 / Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro. – Jaguariúna, SP : Embrapa Meio Ambiente, 2012.

31 p. — (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 89).

1. Biopesticidas. 2. Testes toxicológicos. 3. Análise de risco. I. Castro, Vera Lucia Scherholz Salgado de. II. Título. III. Série.

CDD 615.907

Autores

Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro

Veterinária, Doutora em Patologia Experimental e
Comparada, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km
127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000
Jagariúna, SP.
castro@cnpmma.embrapa.br

Sumário

1. Introdução	06
2. Aspectos relativos aos procedimentos envolvendo animais-teste e amostragem: cuidados na manipulação	10
2.1. Substância a ser testada – fungos ou bactérias	10
2.2. Concentração do inóculo – fungos ou bactérias	11
2.3. Animais-teste a serem utilizados	12
2.4. Eutanásia de animais	12
2.5. Avaliações clínicas dos animais testados	13
2.6. Necropsia e quantificação do agente	14
2.7. Quantificação do microrganismo nos órgãos	15
3. Interpretação dos dados de persistência do agente em roedores ..	16
4. Avaliação do método usado para plaqueamento do AMC	18
5. Verificação do ambiente laboratorial	21
5.1. Monitoramento da contaminação laboratorial	23
6. Conclusões finais e perspectivas	26
7. Referências bibliográficas	28

Avaliação Toxicopatológica de Biopesticidas em Roedores: Revisão dos Ensaios da Fase 1

Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro

1. Introdução

O uso de microrganismos, seus produtos ou metabólitos para o controle de organismos indesejáveis na agricultura tem se tornado cada vez mais comum em diversos países. Embora a grande maioria dos agentes microbianos de controle (AMCs) utilizados como biopesticidas sejam considerados seguros, podem, potencialmente, perturbar as comunidades ecológicas mesmo de forma transitória (BAKKER et al., 2002). As capacidades de sobrevivência, persistência, multiplicação, disseminação, e manifestação de patogenicidade e toxicidade nos organismos não-alvo estão envolvidas no risco que um microrganismo pode apresentar para o ambiente.

A concessão de registro de AMCs pelos órgãos federais que registram esses produtos no Brasil está sujeita à prévia apresentação de dados de análise de risco e impacto ambiental que indiquem conclusivamente, caso a caso, que o produto quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos adversos aos seres humanos ou ao ambiente. Este procedimento se aplica aos microrganismos de ocorrência natural e àqueles que são estirpes obtidas através de seleção por métodos convencionais.

A avaliação de risco de produtos microbianos utilizados como pesticidas é subsidiada por avaliações microbiológicas, testes toxicológicos e ecotoxicológicos. A avaliação de risco visa proporcionar previsões suficientemente precisas de efeitos adversos que o biopesticida pode ter sobre a saúde humana e o ambiente. Na Instrução Normativa (IN) Conjunta no. 03, de 10 de março de 2006, entre MAPA, ANVISA e IBAMA, foram definidos critérios e exigências específicas para o registro de agentes microbiológicos de controle no Brasil.

O atual esquema brasileiro de avaliação dos agentes microbianos foi adaptado da legislação internacional, seguindo o esquema de fases (ESTADOS UNIDOS, 1996a, b). Para os estudos sobre a segurança da saúde humana são usados roedores, tais como ratos Wistar. Os testes iniciais dos protocolos são projetados para detectar efeitos como alergenicidade, toxicidade, infectividade e patogenicidade (CASTRO et al., 1999; ESTADOS UNIDOS, 1996a). Os testes são realizados em fases sequenciais na dependência dos resultados obtidos em cada fase.

A fase I consiste em avaliar os efeitos de uma dose de máximo risco de exposição, em uma bateria de testes de curta duração. Dada a alta concentração do AMC utilizada na fase I, supõe-se que esta seja suficiente para ocasionar efeito adverso no organismo não-alvo se o agente possuir potencial de ocasionar infecção ou se ocorrer a presença de toxina. A dose desafio considerada para mamíferos é 10^8 UFC do agente microbiano por animal teste. Exemplos de testes realizados com agentes microbianos podem ser encontrados em Castro et al. (2001) e Castro e Melo (2007).

Após a sua realização, os dados da fase I devem ser examinados. Caso seja encontrado um efeito significativo na fase I, então se procede aos testes da fase II e assim sucessivamente.

No caso dos estudos em roedores, a fase II é realizada quando se observa toxicidade ou infectividade na fase I, porém não há evidência de patogenicidade. Já na fase III são realizados testes para avaliar a patogenicidade detectada na fase I. A fase III pode também ser

necessária quando o agente é ou pode ser um parasita intracelular de mamíferos como um vírus ou um protozoário.

Apesar do grande número de fatores que podem alterar a interação agente biológico – hospedeiro, acredita-se que os dados dos testes da primeira fase (fase I) possam contribuir para uma avaliação criteriosa dos riscos potenciais, na maioria dos casos. É desta fase que trata o presente documento.

Os protocolos experimentais para a avaliação de biopesticidas em roedores são usados há alguns anos. Os procedimentos utilizados podem ser encontrados em Castro et al. (1999) e Estados Unidos (1996a, b). A realização desses testes requer, porém, alguns cuidados em sua execução. De acordo com Menezes et al. (2010), em um plaqueamento complementar (em BDA) da ração oferecida aos ratos e também da palha colocada nas gaiolas, observou-se a ocorrência de alguns gêneros fúngicos, como *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Esses dados, em conjunto aos resultados de seu trabalho das amostras de rim, fígado e sangue de animais expostos ao fungo *Trichoderma* sp. sugerem a possibilidade da sobrevivência desses fungos dentro do corpo do animal, e de formas de translocação entre os diversos tecidos animais. Os autores concluem que se fazem necessárias metodologias voltadas à detecção de esporos e/ou propágulos de fungos em amostras de tecidos e órgãos animais.

A identificação da distribuição do agente, sua multiplicação e possível estabelecimento em órgãos e/ou fluidos devem ser feitas sob procedimentos rigorosos, pois é a partir desses dados que serão observadas a possibilidade de infectividade e persistência do agente microbiano no organismo do roedor. A falta de detecção de qualquer um desses eventos, por exemplo, por problemas na técnica empregada de plaqueamento das amostras e na identificação do agente pode levar a conclusões errôneas a respeito da segurança do biopesticida avaliado.

Nesse contexto, é desejável que se estabeleçam parâmetros criteriosos quanto aos métodos de recuperação de microrganismos nas amostras

de tecidos estudados, pois a boa condução desses procedimentos será crítica para o alcance de resultados confiáveis.

De igual forma, a definição de parâmetros de aceitação da presença de contaminantes durante a condução desses testes é ponto não estabelecido em normas ou em publicações nacionais sobre o tema. Nesse aspecto, existem três nichos que favorecem a contaminação cruzada no laboratório: 1) equipamentos e material utilizado nos testes; 2) recursos humanos que frequentam o laboratório; 3) superfícies contaminadas.

A presença de contaminação ambiental também pode levar a erros na interpretação dos resultados, especialmente quando os agentes em estudo podem ser facilmente encontrados em diferentes ambientes e/ou não possuem características morfológicas únicas que os distingam de qualquer outro durante a sua identificação nas amostras dos animais.

Em consequência, para a sua adequada condução, devem ser observados cuidados quanto ao ambiente de criação dos animais, quanto às salas de preparo e manipulação de todo o material do laboratório, e quanto aos ambientes de realização dos ensaios.

O propósito do presente trabalho é apresentar alguns cuidados a serem tomados durante a condução destes testes para biopesticidas cujos organismos sejam bactérias ou fungos, como também apresentar sugestões quanto ao aprimoramento metodológico dos mesmos. Nesta publicação, portanto, são apresentados aspectos relativos ao controle de qualidade laboratorial e à avaliação do método usado para plaqueamento e crescimento dos AMC – fungos e bactérias, com base na experiência do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente. Além disso, são tecidas considerações quanto ao significado da persistência do AMC no organismo animal.

2. Aspectos relativos aos procedimentos envolvendo animais, teste e amostragem: cuidados na manipulação

O fluxo de trabalho deve ser conduzido de forma a minimizar riscos significativos de contaminação cruzada para o ensaio realizado. Assim, o trabalho deve ser sequencial para evitar possíveis contaminações de amostras e as atividades devem ser separadas por tempo e espaço, evitando-se o transporte frequente dos materiais de uma área para outra. Todo o material necessário deve ser organizado antes do início do teste.

Em relação ao trabalho realizado na cabine de fluxo laminar para homogeneização e plaqueamento das amostras devem ser tomados os seguintes cuidados: limpar todos os objetos antes de introduzi-los, organizar o material de modo que os itens limpos e contaminados não se misturem e colocar os recipientes para descarte de material no fundo ou lateralmente da área de trabalho da cabine.

A seguir, são abordadas quais as precauções a serem tomadas ao manipular as amostras e os organismos teste.

2.1. Substância a ser testada – fungos ou bactérias

Devem ser testados o agente ativo, o agente inativado e o controle. O procedimento de preparo da substância teste na dose a ser administrada deve ter seu procedimento padronizado, como também o veículo utilizado para diluição deve estar isento de qualquer contaminação.

Em geral, a forma de um microrganismo a ser testado deve ser aquela presente no produto formulado a ser registrado. O microrganismo teste também deve ser equivalente àquele que se pretende registrar em relação ao estágio de crescimento, constituição celular (organelas e apêndices) e expressão de traços fenotípicos (incluindo produtos de genes que tenham sido intencionalmente introduzidos no microrganismo).

O mesmo procedimento deve ser usado para testar as formas do microrganismo nas quais possa ocorrer alguma exposição significativa, ou naquelas em que ocorrerem mudanças na forma anterior do microrganismo, ou ainda se puderem ocorrer alterações em espécies visadas ou não visadas. O lote das substâncias testadas deve preferencialmente ser o mesmo durante todo o estudo, e as amostras-teste recebidas do laboratório fornecedor do microrganismo deverão ser guardadas de forma que não sofram contaminação em frascos esterilizados e fechados.

Se a estabilidade da substância teste (ex. quantidade de esporos presentes) não puder ser mantida devido a rápida multiplicação dos microrganismos durante os estudos, ou se por outras razões não for possível usar o mesmo lote durante o teste, lotes subsequentes da substância teste por replicação deverão ser confeccionados para que sejam tão idênticos quanto possível ao lote original. A colônia de microrganismo, quando replicada em condições padronizadas e estéreis, não sofrerá contaminação e manterá as suas características iniciais.

2.2. Concentração do inóculo – fungos ou bactérias

As células são colhidas do meio de cultura e é preparada uma suspensão. A concentração do inóculo pode ser medida através de absorbância ao espectrofotômetro. Através de diluições tentativas, ajusta-se a turbidez para o valor desejado (10^8 unidades do AMC).

No caso de bactérias a 600nm, 10^8 - 10^9 ufc./ml correspondem a uma absorbância de 0,3-0,4 respectivamente (LELLIOTT; STEAD, 1987). Isto porque a quantidade de luz absorvida e dispersada (densidade óptica da cultura) é proporcional à massa de células (densidade celular) no trajeto luminoso. Para a sua medida pode ser usado um espectrofotômetro ou colorímetro, colocando a suspensão celular em uma cubeta e construindo uma curva (% de luz x concentração celular). Contudo, outros materiais em suspensão, células mortas e culturas intensamente coradas limitam a técnica.

No caso de fungos, a concentração do inóculo é determinada pela contagem dos esporos em uma câmara de Neubauer. A suspensão de esporos deve ser preparada utilizando-se uma gota de Tween 80 para cada 100 ml a fim de evitar a agregação dos esporos. Esta suspensão deve ser agitada e depositada imediatamente em um dos campos laterais da câmara com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A seguir, proceder à contagem ao microscópio.

2.3. Animais-teste a serem utilizados

Todos os animais-teste devem possuir boas condições de saúde e estarem livres de parasitas ou patógenos. Os animais adquiridos para o teste necessariamente possuem boa procedência, de preferência de biotérios certificados ou reconhecidos por entidades nacionais ou internacionais. As fêmeas são nulíparas e não prenhes. Os animais são adultos jovens, com variação de peso não superior a 20% do peso médio de cada sexo. As fêmeas são testadas entre 200 a 220 g e os machos entre 210 a 230 g.

Todas as observações relacionadas à coleta de amostras devem ser realizadas no mesmo período do dia. Para esta análise é utilizado um número pré-determinado de animais, de acordo com o procedimento experimental estipulado pelo estudo, 3 fêmeas e 3 machos por grupo experimental. Os animais são mantidos em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada, com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas. Os animais podem ser mantidos em salas isoladas ou em estantes ventiladas a fim de evitar possíveis contaminações.

2.4. Eutanásia de animais

Para a avaliação de infectividade e taxa de eliminação, o AMC deve ser detectado em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos de animais tratados por sexo, de todos os grupos, sacrificados de acordo com procedimentos éticos após a administração do AMC. Uma boa fonte de consulta a respeito dos melhores métodos é o AVMA Guidelines on Euthanasia (2007) disponível em http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf.

Alguns cuidados na manipulação dos animais podem ser encontrados em material produzido pela Fiocruz no endereço http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio_apostilha.pdf. Outras informações podem ser obtidas no Manual de Biossegurança – Parte IV Manipulação de animais em http://www.ccs.saude.gov.br/visa/publicacoes/arquivos/P4_Manipula%C3%A7%C3%A3o_de_Animais.pdf. As páginas das Universidades (exemplo Instituto de Biologia da Universidade de Campinas) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) também possuem material disponível a respeito do assunto em suas páginas na internet.

O projeto de lei que regulamenta o uso de animais em pesquisas científicas no país é conhecido como Lei Arouca. O projeto estipula como condição indispensável para requerer credenciamento junto ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) a criação de uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

A CEUA é integrada por médicos veterinários e biólogos, docentes e pesquisadores na área específica e um representante de sociedades protetoras de animais. A comissão de ética deve examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa para determinar sua compatibilidade com a legislação, além de notificar o CONCEA e as autoridades sanitárias sobre qualquer acidente com os animais.

O CIUCA (Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais) tem entre suas atribuições registrar no CONCEA, as instituições que criam ou utilizam animais com finalidade de ensino e pesquisa científica. Maiores informações estão disponíveis na página do CONCEA: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553.html>

2.5. Avaliações clínicas dos animais testados

Um exame clínico de todos os animais deve ser feito diariamente. Os animais são pesados ao início, a cada intervalo para quantificação do microrganismo e ao término do experimento.

Outras observações a serem realizadas incluem alterações de pele (incluindo sinais de irritação) e pelo, olhos e mucosas, sistema respiratório, sistema circulatório, sistema nervoso periférico e central, atividade somatomotora e comportamento (atenção especial deve ser dada à ocorrência de tremores, convulsões, diarreia, letargia, salivação, sono e coma). Deve ser observado diariamente se ocorre morte natural de algum animal. Os animais que morrem durante o teste são necropsiados.

2.6. Necropsia e quantificação do agente

Deve-se observar por inspeção visual o aspecto geral dos animais antes da necropsia (aparência, presença ou ausência de sintomas, alterações comportamentais, etc). Alterações na aparência e no comportamento bem como o aparecimento de sintomas são indicativos de que o agente microbiano possa estar produzindo uma patologia no animal-teste. Estas observações devem ser anotadas e confrontadas aos achados na necropsia para que a necessidade de realização de testes adicionais e a conclusão da segurança do uso do biopesticida sejam as mais criteriosas possíveis.

Devem ser anotadas quaisquer presenças de líquidos em cavidades e alterações macroscópicas de cor e textura nos tratos gastrointestinal e urogenital, coração, pulmões, baço, fígado, rins, cérebro e qualquer lesão deve ser removida para posterior avaliação por técnica histopatológica ou outra que seja adequada. A avaliação da eliminação do AMC nas fezes (*clearance*) deve ser realizada nos intervalos predeterminados de sacrifício após a exposição por via oral dependendo do microrganismo.

Os tecidos e/ou fluidos removidos assepticamente e as fezes coletadas diretamente do intestino reto do animal devem ser colocados em tubos estéreis com 3,0 ml de água peptonada (0,1%), pesados e homogeneizados para proceder à quantificação do agente. Após a administração intravenosa, seguindo-se os intervalos propostos durante o teste, é imprescindível a quantificação do agente no sangue.

A inconsistência na explicação para os achados necroscópicos nos grupos de animais expostos durante o teste poderá ser evitada com a inclusão de procedimentos adequados de controle laboratorial, manipulação adequada dos animais, treinamento dos analistas e comparação com os dados do grupo controle do teste.

Caso sejam encontradas lesões que possam gerar dúvidas quanto a sua origem (se devido à exposição ao agente avaliado ou a outros fatores como manipulação, stress, etc.), pode-se tentar utilizar outras técnicas complementares como as imunohistoquímicas - se disponíveis, na tentativa de explicar os achados e identificar o agente infeccioso.

2.7. Quantificação do microrganismo nos órgãos

Os animais são abertos e os órgãos, tecidos e fluidos são retirados em câmara de fluxo laminar nos intervalos determinados após a exposição. O AMC deve ser quantificado nos rins, fígado, cérebro, pulmões, baço, sangue e nódulos linfáticos representativos. É possível que outros tecidos, órgãos e fluidos corpóreos tenham que ser examinados de acordo com a natureza dos efeitos tóxicos e patogênicos observados. As fezes são coletadas diretamente do intestino reto do animal no caso de exposição por via oral.

Os tecidos e/ou fluidos removidos assepticamente e as fezes coletadas devem ser colocados em tubos estéreis com 9,0 ml de solução salina (0,9%). Os tubos são então pesados e seu conteúdo homogeneizado para proceder à quantificação do agente. A cada nova amostra, a haste do homogeneizador de tecidos e o material cirúrgico utilizados são limpos com solução salina, seguida de solução de hipoclorito a 2% e solução salina esterilizada em frascos distintos.

A seguir, o material analisado e devidamente homogeneizado é submetido a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em solução salina esterilizada e plaqueado em meio de cultura apropriado em triplicatas. Deve ser utilizada uma pipeta para cada diluição e marcadas as placas e os frascos para diluição de maneira ordenada na sequência da

diluição, obedecendo-se aos cuidados de assepsia. De cada diluição é retirada uma alíquota de 0,1 mL e realizada a inoculação na superfície do meio solidificado, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky.

As amostras plaqueadas são incubadas por tempo e temperaturas adequadas para o crescimento do microrganismo. O número de colônias obtidas por placa é anotado e o resultado expresso como média de repetições e apresentado como unidades formadoras de colônias (UFC / g de órgão analisado).

O meio de cultura normalmente utilizado para bactéria é o nutriente ágar e para fungos o DBA (batata, dextrose, agar). Contudo, o uso de meios mais adequados ou específicos deve ser considerado conforme as características do agente em estudo. Na ocasião da confecção das placas, é necessário esperar o meio solidificar e inverter as placas para evitar a água de condensação na superfície do ágar durante a incubação.

3. Interpretação dos dados de persistência do agente em roedores

Não há qualquer critério específico para a determinação de um período mínimo de tempo, seja em semanas ou meses, para definir a persistência incomum de um agente em um animal teste. Acredita-se que esta condição seja melhor definida no contexto de dados que são obtidos na bateria de estudos, segundo o tipo de microrganismo e a via de exposição.

Os dados são interpretados levando em conta as curvas de declínio gerado, e também considerando qualquer evidência de que o agente microbiano se reproduza no animal teste. Também devem ser ponderados os dados bibliográficos consultados em diversas fontes técnico-científicas. Estes dados devem ser interpretados à luz das evidências existentes no que seja o mais avançado do conhecimento à data da realização dos ensaios.

No organismo-teste são encontradas muitas áreas estéreis e outras com uma extensa microbiota, assim como áreas cuja microbiota é limitada ou abrigam uma microbiota temporária. Estes habitats temporários incluem a laringe, traquéia, brônquios, sinus nasais, esôfago, estômago, porção superior do intestino delgado, do trato urinário superior (incluindo a uretra posterior) e as áreas distais correspondentes aos órgãos genitais masculinos e femininos. Conclusões acerca do significado do isolamento de um microrganismo de áreas normalmente estéreis devem ser baseadas na obtenção apropriada da amostra e da análise realizada (SOUZA; SCARCELLI, 2000).

Uma hipótese a ser considerada é a possibilidade de contaminação dos isolados e/ou do material utilizado nas análises. Outra hipótese a ser considerada é a translocação para outros tecidos (GEORGE et al., 1996). Neste caso, provavelmente a primeira via de disseminação do microorganismo a partir da exposição oral seria os linfonodos mesentéricos e posteriormente o fígado e o baço. De qualquer forma, é importante tomar cuidados durante o manuseio de amostras e adotar medidas de assepsia para evitar qualquer contaminação que possa confundir a análise dos resultados.

Na dependência do comportamento do AMC testado devem ser estabelecidos os intervalos apropriados para a determinação do *clearance* e da persistência no organismo animal em intervalos de horas após a exposição ou até 14 dias. O número destes eventos será suficiente para o estabelecimento de forma adequada do padrão de eliminação quando o microrganismo testado for detectado em pelo menos dois intervalos diferentes da exposição e a seguir não mais.

A estimativa da taxa de eliminação do AMC pode ser feita com base nos dados de recuperação do AMC nos órgãos, fezes, sangue e tecidos e descrevendo o método de avaliação da recuperação do AMC nos órgãos e qual o limite de detecção do método. É necessário esclarecer qual o critério utilizado para definir a taxa de eliminação (*clearance*). Por exemplo, pode-se adotar o tempo (em horas ou dias da exposição) no qual a detecção de AMC nos tecidos for $< 10^2$ UFC/g

de tecido em duas amostras coletadas consecutivamente como o ponto final de avaliação.

Contudo, se o microrganismo é eliminado rapidamente do organismo, pode se tornar difícil estabelecer estes eventos. Se no 7º e no 14º dias a recuperação for abaixo do limite de detecção do método não se faz necessário a tentativa de recuperação no 21º dia sendo, porém, necessária a continuação do experimento até o 21º dia para as observações clínicas, os sacrifícios e a necropsia.

Outra limitação é o fato de alguns microrganismos serem de difícil isolamento, fazendo com que o agente não seja encontrado nas amostras testadas. Neste caso, é importante a avaliação do método usado para plaqueamento e o uso de técnicas alternativas. Estas questões serão abordadas a seguir.

4. Avaliação do método usado para plaqueamento do AMC

A compreensão dos vários fatores que impactam na precisão do método de plaqueamento é importante para verificar a adequação da contagem de microrganismos.

Dois aspectos são importantes na fase de plaqueamento e quantificação das colônias: a) ter certeza de que o microrganismo encontrado é exatamente aquele que foi administrado; b) a verificação da viabilidade do agente para determinar a infectividade e persistência.

A viabilidade é um fator importante de ser analisado, pois mesmo que não resulte em achados macroscópicos ou alterações nos testes histopatológicos, o agente pode provocar problemas em caso de queda de resistência do organismo não-alvo. Reconhece-se, hoje, que muitos microrganismos, ordinariamente considerados como

não patogênicos, podem produzir infecção e doença na dependência dos mecanismos de defesa do hospedeiro e não só dos fatores de virulência (SOUZA; SCARCELLI, 2000).

O protocolo para registro pede somente a citação do método de plaqueamento usado para o microrganismo testado. Contudo, devido a sua importância para o resultado final, é indicado que a validação da metodologia de detecção e quantificação do AMC estudado deva ser feita antes da execução do estudo em órgãos, tecidos, sangue e fezes e não posteriormente.

A adequação do método de plaqueamento empregado para a identificação e contagem do agente pode ser verificada com o enriquecimento de amostras com diferentes concentrações do agente em estudo e posterior contagem para verificar se há correspondência entre o que foi administrado e o que foi detectado.

Além da recuperação de amostras fortificadas, poderá ser utilizada a semeadura da cultura pura do AMC nos meios em teste (p. ex. 4 amostras por lote de teste) e observada a contagem das colônias. Esta não deve diferir em mais de 10% entre si o que também servirá para verificação da qualidade do meio de cultura. O desempenho apropriado dos meios de cultura, diluentes e soluções também deve ser verificado com relação à recuperação dos microrganismos alvo.

Os resultados dos estudos de validação de métodos de ensaios deverão ser adequadamente registrados. Para cada ensaio pode ser elaborado um plano de validação, que deve ser documentado durante a sua realização. Ele apresentará informações quanto à descrição e cronograma das etapas do processo, às especificações e sistemática de aprovação de insumos, reagentes e equipamentos e instrumentos; à sistemática de validação e à aplicação de ações corretivas para resultados inadequados. Assim, pode-se decidir por mudar o procedimento, investir em novos equipamentos ou ainda em treinamento para os colaboradores.

Testes bioquímicos podem ser empregados a fim de verificar a viabilidade do AMC encontrado nas amostras dos tecidos. Neste caso, os meios de cultura e reagentes devem ser testados com linhagens-padrão. Contudo, estes testes são influenciados por fatores de crescimento e às vezes fornecem resultados instáveis e muitas vezes são necessários testes complementares.

Outras metodologias podem então ser utilizadas em complemento à abordagem tradicional de plaqueamento, aumentando consideravelmente a amplitude de diagnóstico. Atualmente, técnicas de biologia molecular e quimiossistemáticas, se disponíveis, podem ser utilizadas para a confirmação de que o agente microbiano testado é o mesmo que foi recuperado das amostras.

Ferramentas moleculares baseadas na análise de DNA têm sido aplicadas com sucesso na identificação. Para análises quantitativas e detecção específica podem ser utilizadas técnicas de PCR competitiva e em tempo real. Na PCR competitiva, fragmentos de DNA contendo sequências de nucleotídeos homólogas àquelas do DNA de interesse são adicionados em quantidades conhecidas às reações de PCR e co-amplificados com o DNA alvo. Outro método é a PCR em tempo real, onde sondas ou marcadores fluorogênicos são adicionados às reações de PCR e permitem o correto monitoramento dos produtos resultantes durante a amplificação, pois aumentam em proporção direta da quantidade de produto da PCR (reação em cadeia da polimerase). Testes para quantificar RNAm também são uma opção interessante a fim de verificar a viabilidade do agente, já que ele é o intermediário na expressão gênica (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

O progresso no desenvolvimento de métodos e instrumentos analíticos tornou possível o uso de métodos quimiossistemáticos, onde é possível separar e identificar as moléculas encontradas nos diversos componentes celulares. Neste sentido, para confirmar a espécie das bactérias (p. ex. bacilos) recuperadas dos órgãos necropsiados, pode ser realizada a extração de ácidos graxos

da parede celular por meio da identificação dos isolados em cromatografia gasosa (CASTRO; MELO, 2007).

Caso seja necessário para acreditação do laboratório em normas de qualidade como a NBR ISO/IEC 17025:2005 (International Standard Organization), quando é preciso estimar a incerteza, pode ser construído um modelo dos ensaios com AMC em ratos em condições laboratoriais. Em medidas microbiológicas os componentes da incerteza tendem a ser independentes (NIEMI; NIEMELÄ, 2001) e a incerteza combinada é composta da soma das incertezas relativas. Informações a esse respeito também podem ser encontradas em Nliemelä (2003), Foster (2003) e Jarvis et al. (2007) e em Castro (2008) onde é proposto um procedimento para isto.

5. Verificação do ambiente laboratorial

Cada organismo a ser testado como agente de controle tem características de comportamento específicas e é influenciado, segundo estas características, pelas condições ambientais do laboratório (temperatura e luminosidade, por exemplo). Assim, não só os animais-teste requerem cuidados de controle de condições ambientais de criação, mas também são exigidas condições padrão de assepsia para que o ambiente não apresente contaminação cruzada (biopesticida x microrganismos do ambiente do laboratório, por exemplo) ou mesmo desenvolvimento de um microrganismo contaminante na suspensão-teste do biopesticida. Em qualquer um dos casos os resultados ficarão comprometidos e a reprodutibilidade dos testes poderá não ser obtida.

A conformidade dos ensaios realizados para avaliar os efeitos destes agentes em roedores depende, portanto, da manutenção de um rigoroso controle ambiental para evitar contaminação nas amostras testadas bem como manter a higiene dos animais. Para garantir o pleno funcionamento dos equipamentos e materiais utilizados nas

análises, periodicamente devem passar por manutenções preventivas, calibrações periódicas e possuírem localização adequada no laboratório que não introduza contaminação ao sistema.

As fontes que podem levar contaminantes para uma colônia de animais de laboratório são várias, como falhas na filtragem do ar ambiente, falhas na estrutura física da instalação, falhas nos processos de desinfecção e esterilização, invasão de insetos, manipulação dos animais pelos tratadores - cabelos, roupas e mãos - (FIJAN et al., 2006), sendo essa ultima o maior problema em vários tipos de processos. Assim é recomendado o treinamento, monitoramento e estabelecimento de rotinas para evitar o risco de tais contaminações.

A presença de microrganismos em superfícies de objetos também abre a possibilidade de contaminação através das mãos (RUSIN, 2002; BHALLA, 2004; KRAMER, 2006). Outra fonte importante de contaminação no laboratório é a produção de aerossóis devido a facilidade com que partículas pequenas são produzidas por técnicas comuns de laboratório aliada ao fato de que muitas destas partículas são suficientemente pequenas e conseguem invadir o pulmão (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004, 2006).

A fim de interpretar os dados obtidos no monitoramento da contaminação laboratorial devem ser estabelecidos critérios de análise e aceitação dos mesmos. Para tanto, é necessário estabelecer parâmetros microbiológicos de controle de qualidade laboratorial, que até o presente momento não estão bem delineados para laboratórios de pesquisa na literatura especializada. As normas existentes para laboratórios de prestação de serviço (análises clínicas, análises microbiológicas) não se aplicam diretamente ao caso presentemente abordado – testes com biopesticidas em organismos não-alvo.

O intervalo entre as verificações de controle de qualidade ambiental laboratorial para monitorar o desempenho dos ensaios será influenciado pelo número dos ensaios reais, de acordo com a atividade do laboratório. Ele tem o objetivo de assegurar a

consistência dos resultados obtidos.

Uma forma de esquematizar os dados e obter uma série histórica da qualidade ambiental laboratorial é a utilização de uma carta de controle que permita perceber quando os procedimentos efetuados não foram eficientes. O planejamento de controle de qualidade laboratorial ambiental, de equipamentos e materiais terá os parâmetros aceitáveis de contaminação previamente definidos. As mudanças na média do processo são detectadas pela carta de controle de Shewhart. Elas são construídas com base nos valores da média e da amplitude obtidos em cada ocasião de estudo, num gráfico delimitado por linhas horizontais, denominadas “limites de controle”. Podem ser usados um, dois ou três pares de linhas horizontais nas cartas da média e amplitude. Essas linhas são posicionadas a 1, 2 (zona de aviso) e 3 (zona de ação) desvios padrão em torno da média. O limite interno de alerta e de ação para cada ambiente analisado são determinados com base em análises estatísticas (desvio médio e desvio padrão) que são expressos em UFC (unidades formadoras de colônia) por m³.

Um programa de monitoramento da contaminação dos equipamentos e materiais utilizados nos ensaios também deve ser realizado cada vez que houver algum ajuste no método de descontaminação ou problemas com o equipamento utilizado.

5.1. Monitoramento da contaminação laboratorial

Deve ser realizado o monitoramento ambiental com a escolha de pontos fixos do laboratório para coleta de amostras, seguido pela contagem de colônias do microrganismo teste (MELO et al., 2000; SALO et al., 2000). As contagens ambientais aceitáveis devem ser determinadas antes do estudo, mas não devem ser aceitas quaisquer contagens do microrganismo-teste. Os procedimentos de descontaminação adotados devem ser reavaliados caso seja constatada a presença do microrganismo-teste ou uma contagem acima da anterior.

Também deve ser realizado um programa de monitoramento dos equipamentos e materiais utilizados nos ensaios. Superfícies, material cirúrgico e equipamentos como autoclave, homogeneizador e câmara de fluxo laminar também devem sofrer um programa de monitoração de controle da contaminação e desinfecção. É muito importante ainda a utilização de proteção individual como roupas apropriadas (avental) ao tipo de ensaio realizado no laboratório.

As placas para monitoramento da contaminação ambiental devem, preferencialmente, ser expostas sempre no mesmo local para construir um histórico de dados da contaminação do ambiente de laboratório. Existem vários meios de cultura que podem ser usados para indicar o crescimento geral de microorganismos, porém os mais utilizados são: PCA (plate count agar) ou ágar nutriente para crescimento de bactérias gerais e PDA (potato dextrose ágar), Sabouraud dextrose ágar ou DG18 (agar Dicloran 18% Glicerol) para crescimento de fungos. As placas devem ser expostas ao ar por 15 min. Em geral, para verificação de bactérias, as placas são incubadas em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48h e para contagem de bolores e leveduras, as placas são incubadas em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 120h.

O material cirúrgico, homogeneizador, câmara de fluxo laminar, vidraria e as cânulas (exterior) poderão ser testados com o uso de swabs de superfícies e posterior plaqueamento e identificação/contagem de colônias. A contagem das colônias pode seguir uma série histórica para comparação. O swab deve ser colocado em tubos ou frascos estéreis para posterior plaqueamento em meio adequado para o microrganismo-teste em até 6 h da coleta. Os frascos devem conter 25 ml de diluente e os tubos 10 ml de diluente (água peptonada 0,1% estéril). Após a introdução do swab na solução de água peptonada estéril, a sua ponta deve ser pressionada contra a borda do recipiente de forma a escorrer o excesso do algodão. O swab não deve ser segurado próximo do algodão e a parte manuseada da haste deve ser quebrada na borda interna do tubo ou frasco diluente após a coleta evitando a sua contaminação. As recomendações para a coleta de

amostras de vários materiais são as seguintes:

a) Equipamentos e utensílios grandes: Colocar luvas antes do início da coleta. Selecionar aleatoriamente 5 pontos de aproximadamente 10 cm² sobre a superfície a ser coletada usando amostrador estéril. Aplicar o swab umedecido com água peptonada estéril por toda a superfície em um ângulo de 30°. Para cada ponto utilizar um swab. Colocar os 5 swabs num frasco com 25ml de diluente.

b) Equipamentos e utensílios pequenos: colocar luvas. Aplicar o swab umedecido com água peptonada estéril em apenas 1 ponto de aproximadamente 10 cm² usando o amostrador. Rodar o Swab por toda a superfície em movimentos da esquerda para a direita e de cima para baixo. Colocar o swab num tubo com 10ml de diluente.

c) Contagem das colônias: para comparação histórica (SALO et al., 2000)

$Na = NvV/A$, onde: Na = no de colônias/cm²; Nv = no de colônias/diluição; V = volume da amostra (mL) e A = área de coleta pelo swab.

As cânulas (contaminação interna) e as pipetas são lavadas com um pouco de água peptonada estéril, que será colocada em meio de cultura e incubada, seguida de plaqueamento e identificação de colônias.

A autoclave é testada antes de sua utilização no teste através da colocação de amostras previamente contaminadas com o agente a ser testado, ou indicadores biológicos, que deverão ser incubados para verificação do crescimento ou não de colônias. Para tanto, será verificada a temperatura para um ciclo de operação e cada configuração de carga usada na prática. Este processo deve ser repetido quando indicado pelos resultados de verificações ou após o reparo do equipamento.

Outros materiais devem ser submetidos à limpeza caso entrem em contato com as amostras de microrganismos, tais como: recipientes de vidro ou plástico, cânulas de metal ou polietileno, pipetas, termômetros, balanças, ou qualquer outro acessório de plástico, metal ou vidro que possa eventualmente entrar em contato com o AMC.

6. Conclusões e perspectivas

O estabelecimento de um padrão aceitável de recuperação do agente microbiano em uma faixa previamente estabelecida irá, com certeza, tornar o teste mais confiável. De igual forma, alterações no método de plaqueamento do AMC e a introdução de métodos alternativos moleculares aumentarão a credibilidade e possivelmente facilitarão a identificação do agente nos tecidos, órgãos e fluidos animais. Contudo, o estabelecimento destes parâmetros e técnicas dependerá em parte de cada agente e o significado de seus achados é uma discussão ainda a ser exaurida.

A obtenção de dados a partir de condições laboratoriais adequadas e devidamente controladas por parâmetros claramente definidos também poderá contribuir para o aprimoramento desses instrumentos de avaliação de risco e facilitar as decisões envolvendo a liberação e o uso comercial destes produtos. A comprovação da competência técnica dos procedimentos irá assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos.

Por sua vez, trabalhos recentes recomendam o uso de testes *in vitro* após a sua validação devido à necessidade de redução do uso de animais em testes laboratoriais por questões éticas, já que a utilização de animais na pesquisa tem sido razão de diversas discussões em função do grande número necessário. Existe uma tendência mundial para reavaliar a utilização de animais nos experimentos, concretizada a partir de um programa denominado de 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement), que objetiva, além de diminuir o número de animais,

minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes in vivo. Trata-se de um processo complexo que abrange desde o seu desenvolvimento até sua aceitação regulatória e adoção por diversas organizações (CAZARIN et al., 2004).

Nesse sentido, algumas moléculas como microRNAs (miRNAs) circulantes surgiram como novos biomarcadores não-invasivos para várias doenças e outros tipos de lesão tecidual. Estes microRNAs (miRNAs) são pequenos, com aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, são expressos em todas as células animais e têm um papel fundamental em atividades celulares, como o desenvolvimento, diferenciação celular, proliferação, apoptose, controle de ciclo celular, metabolismo e câncer. Os miRNAs circulantes estão presentes em vários fluidos corporais extracelulares de uma forma estável e a coleta de amostra pode ser feita em várias amostras sequenciais de um animal, ao invés de recolher amostra de tecido em um único ponto no tempo após o sacrifício (YANG et al., 2012).

No futuro, além de possíveis biomarcadores, o uso de testes de citotoxicidade e o uso de modelos computacionais para verificação dos efeitos de possíveis toxinas produzidas pelos AMC devem ser avaliados como alternativas e/ou complemento aos testes com roedores já na Fase 2.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Habilitação para laboratórios de microbiologia**. Brasília, DF, 2006. 37 p. (Série Habilitação, v.3).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Segurança e controle de qualidade no laboratório de microbiologia clínica: módulo II**. Brasília, DF, 2004. 37 p.

BAKKER, P.; GLANDORF, D.; VIEBAHN, M.; OUWENS, T.; SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K.; THOMASHOW, L.; THOMAS-OATES, J.; LOON, L. van. Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. **Antonie van Leeuwenhoek**. Amsterdam, v. 81, n. 1-4, p. 617-624, 2002.

BHALLA, A.; PULTZ, N. J.; GRIES, D. M.; RAY, A. J.; ECKSTEIN, E. C.; ARON, D. C.; DONSKEY, C. J. Acquisition of nosocomial pathogens on hand after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 25, n. 2, p. 164-167. 2004.

CASTRO, V. L. S. S. de. **Validação de testes de biopesticidas em mamíferos: princípios e identificação de fatores componentes da incerteza**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 28 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 72).

CASTRO, V. L. S. S. de; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, G. J. de; DE NARDO, E. A. B.; OLIVEIRA, M. C. B. de. **Protocolo: avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas: v. II: uma proposta para os órgãos federais registrantes: testes toxicopatológicos em mamíferos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 39 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 10).

CASTRO, V. L. S. S. de; JONSSON, C. M.; MELO, I. S. de; NUNES, F. V. Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, Coimbra, v. 4, n. 1, p. 8-24, 2001.

CASTRO, V. L. S. S. de; MELO, I. S. de. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos à *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2007.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Microbial pesticide test guidelines**: OPPTS 885.3050: acute oral toxicity/pathogenicity. Washington, D.C., 1996a. 8 p.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Microbial pesticide test guidelines**: OPPTS 885.3000: background-mammalian toxicity/pathogenicity/infectivity. Washington, D.C., 1996b. 8 p.

FIJAN, S.; CENCIC, A.; TURK, S. S. Hygiene monitoring of textiles used in the food industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 356-361, 2006.

FORSTER, L. I. Measurement uncertainty in microbiology. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 86, n. 5, p. 1089-1094, 2003.

GEORGE, E.; KOHAN, M.; NELSON, G.; SCHLUNDT, J. Determination of potential health effects in the mouse comparing intranasal and peroral exposure to *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, Oslo, v. 9, n. 4, p. 143-156, 1996.

JARVIS, B.; HEDGES, A. J.; CORRY, J. E. Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 44-51, 2007.

KRAMER, A.; SCWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BCM Infectious Diseases**, London, v. 6, 130, 2006.

LELLIOTT, R.; STEAD, D. **Methods for the diagnosis of bacterial plant disease**. Oxford: Blackwell, 1987. 216 p.

MELO, J. T.; CRUZEIRO, R. L. A.; MACEDO, J. A. B.; OLIVEIRA, M. G.; TEIXEIRA, J. B. P.; BERALDO, A. F. C. A.; CASTRO, O. F. Avaliação dos níveis de contaminação microbiológica ambiental das diversas áreas de produção do Laboratório de Fitoterápicos do Programa de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 45-50, 2000.

MENEZES, J. P.; JUNGES, E.; BLUME, E.; PEREIRA, M. E. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 17, n. 1, p. 38-50. 2010.

NIEMELÄ, S. Measurement uncertainty of microbiological viable counts. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 8, n. 12, p. 559-563, 2003.

NIEMI, R.; NIEMELÄ, S. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 8, n. 8, p. 372-375, 2001.

NOVAIS, C.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 7, n. 33, p. 10-13, 2004.

RUSIN, P.; MAXWELL, S.; GERBA, C. Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive, gram-negative bacteria, and phage. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 4, p. 585-592, 2002.

SALO, S.; LAINE, A.; ALANKO, T.; SJOBER, A.; WIRTANEN, G. Validation of the microbiological methods Hygicult dipslide contact plate and swabbing in surface hygiene control: a Nordic collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 83, n. 6, p. 1357-1365, 2000.

SOUZA, C. A. I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 275-281, 2000.

YANG, X.; GREENHAW, J.; SHI, Q.; SU, Z.; QIAN, F.; DAVIS, K.; MENDRICK, D. L.; SALMINEN, W. F. Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 125, n. 2, p. 335-344, 2012.



Meio Ambiente

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

